褐飞虱磷脂酰肌醇 3 激酶 p85α 亚基基因 *NlPIK3R*1 的克隆与功能分析

陆潮峰#, 郝培应#, 马 艳, 朱家骏, 冯娅琳, 俞晓平*

(中国计量学院生命科学学院, 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 杭州 310018)

摘要:【目的】PI3K 信号通路在生物体中发挥重要功能,涉及糖和脂质的代谢、细胞和组织生长以及生物个体寿命等。本研究旨在探明该通路中磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)在褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 中的功能。【方法】根据转录组提供的 PI3K p85α 核心序列信息,应用 cDNA 末端快速克隆的技术(RACE)获得了编码 PI3K p85α 的基因 *NlPIK3R*1 的全长 cDNA(GenBank 登录号为 KP635379),并应用荧光定量 PCR 和通过给成虫喂食 ds*NlPIK3R*1 对 *NlPIK3R*1 进行 RNA 干扰(RNAi)分别对该基因的表达规律和功能进行了研究。【结果】荧光定量 PCR 测定结果表明,*NlPIK3R*1 在褐飞虱若虫和雄成虫中表达量均较低,但在怀卵雌成虫中大量表达。RNAi 结果表明,给褐飞虱成虫喂食 0.1 和 0.5 μg/μL ds*NlPIK3R*1 均导致 *NlPIK3R*1 的表达明显受到抑制,高浓度组的抑制效果尤为明显。喂食 ds*NlPIK3R*1 对褐飞虱成虫具有极显著致死效果,高浓度组的褐飞虱成虫在饲喂第 7 天时存活率仅为 37.5%,相比于空白对照组(87.00%)和 ds*GFP* 对照组(76.67%)均达到了极显著差异($P<0.01$)。对 *NlPIK3R*1 的 RNAi 导致褐飞虱成虫羽化率下降和体重变轻。【结论】本研究结果显示,*NlPIK3R*1 基因对褐飞虱的生存、生长和发育具有重要作用,可以作为防治褐飞虱的潜在靶标。

关键词: 褐飞虱; 磷脂酰肌醇 3 激酶; p85α; *NlPIK3R*1 基因; RNA 干扰

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2015)05-0487-09

Molecular cloning and function analysis of phosphatidyl inositol 3 kinase p85α subunit gene *NlPIK3R*1 in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae)

LU Chao-Feng#, HAO Pei-Ying#, MA Yan, ZHU Jia-Jun, FENG Ya-Lin, YU Xiao-Ping* (Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract:【Aim】PI3K signaling pathway plays important roles in many organisms involving in carbohydrate and lipid metabolism, cell and tissue growth, life span, *etc.* This study aims to study the function of phosphatidylinositol 3-kinase in the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*.【Methods】The full-length cDNA of *NlPIK3R*1 gene was cloned by rapid-amplification of cDNA ends (RACE) according to its gene sequence information available in *N. lugens* transcriptome, and this gene encodes the p85α subunit of PI3K (PI3K p85α), with the GenBank accession number of KP635379. Then the real-time quantitative PCR and RNAi by feeding ds*NlPIK3R*1 to *N. lugens* adults were conducted to explore the expression pattern and the function of *NlPIK3R*1, respectively.【Results】The real-time quantitative PCR results showed that the *NlPIK3R*1 gene was slightly expressed in nymphs and male adults of *N. lugens*, but strongly expressed in gravid female adults. RNAi results showed that the expression of *NlPIK3R*1 was inhibited in the two ds*NlPIK3R*1 treatment groups (fed with 0.1 and 0.5 μg/μL ds*NlPIK3R*1, respectively), especially in the high concentration treatment group. Feeding of ds*NlPIK3R*1 led to the death of *N. lugens* adults. The survival rate of *N. lugens* adults in the high concentration treatment group significantly declined by 37.5% at 7 d after treatment, and showed

基金项目: 国家自然科学基金项目(31171860, 30900944); 国家重点基础研究发展计划("973"计划)项目(2012CB114100, 2010CB126200); 浙江省公益性技术应用研究计划项目(2012C22041); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201310356011)

作者简介: 陆潮峰, 男, 1989 年生, 浙江绍兴人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子生物学与生物化学, E-mail: lcf19890107@163.com; 郝培应, 男, 1975 年生, 安徽寿县人, 博士, 副教授, 研究方向为昆虫分子生物学与生物化学, E-mail: haopeiy@163.com

#并列第一作者 Authors with equal contribution

*通讯作者 Corresponding author, E-mail: yxp@cjlu.edu.cn

收稿日期 Received: 2015-01-16; 接受日期 Accepted: 2015-03-31

significant differences ($P < 0.01$) from those in the blank control group (87%) and the ds*GFP* group (76.67%). RNAi also resulted in a reduced eclosion rate and lighter body weight.【Conclusion】The results suggest that the *NlPIK3R*1 gene is very important for the survival and growth of *N. lugens*, and may serve as a potential target for controlling the brown planthopper.

Key words: *Nilaparvata lugens*; phosphatidylinositol 3-kinase; p85α; *NlPIK3R*1; RNA interference

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (Stål)是一种刺吸式水稻害虫,通过直接刺吸、产卵以及传播水稻病毒等方式为害水稻(Park *et al*., 2007),严重威胁亚洲国家的水稻生产(Wang *et al*., 2008; Bottrell and Schoenly, 2012)。目前,防治褐飞虱的主要方法是通过种植抗性水稻和施用农药(Liu *et al*., 2014),但是随着抗性水稻的大规模种植以及化学农药的不合理使用,褐飞虱逐渐产生新的致害性及适应性种群,给害虫防治带来新的挑战。因此,发掘新的褐飞虱防治靶标基因,并发展相应的防治策略,对褐飞虱灾害的治理具有重要意义。

磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)是一类脂质激酶,参与了细胞内大部分信号传导、膜运输以及新陈代谢调节(Jean and Kiger, 2014)。根据其组成结构和功能不同,该激酶家族可以分为 3 类,分别是Ⅰ型PI3K,Ⅱ型 PI3K 和Ⅲ型 PI3K,这 3 种类型都能合成磷脂酰肌醇 3 磷酸(PtdIns(3)P),其中Ⅰ型和Ⅱ型能合成磷脂酰肌醇 3,4 二磷酸[PtdIns(3,4)P2],而只有Ⅰ型 PI3K 能合成磷脂酰肌醇 3,4,5 三磷酸[PtdIns(3,4,5)P3](Backer, 2008; Vanhaesebroeck *et al*., 2010; Marco and Tania, 2012; Posor *et al*., 2013)。Ⅰ型 PI3K 是由 1 个 85 kDa 调节亚基(p85)和 1 个 110 kDa 催化亚基(p110)组成的异质二聚体。Ⅰ型 PI3K 调节亚基 p85 种类有 p85α(或 p50α和 p55α 这 2 个拼接亚型)、p85β、p55γ、p101 和 p84,催化亚基 p110 种类有 p110α, p110β, p110δ和 p110γ。调节亚基 p85 对催化亚基 p110 行使催化功能及其催化稳定性起着必要的作用(Sun *et al*., 2009)。调节亚基 p85α 是由 *PIK3R*1 基因编码的。目前,关于Ⅰ型 PI3K 功能的研究表明,当细胞膜上的酪氨酸激酶和 G 蛋白偶联受体接收到来至细胞外的信号后,会招募Ⅰ型 PI3K(p85-p110 二聚体)到质膜上,p110 亚基通过与 p85 亚基结合把底物 PtdIns(4,5)P2 转化成 PtdIns(3,4,5)P3,进而促使蛋白激酶 B(PKB/Akt)磷酸化。PKB/Akt 又同时控制着细胞内多个重要的信号通路,从而影响细胞生长、增殖、生存,代谢和自噬(Vanhaesebroeck *et al*., 2012)。前期的表达谱研究发现,褐飞虱在从感性水稻品种 TN1 到抗性品种 RH 的适应过程中 *NlPIK3R*1 基因的表达量逐渐下调,提示该基因可能参与了褐飞虱对水稻抗性品种的适应过程。但是,*NlPIK3R*1 基因在褐飞虱中的主要功能尚不清楚,其是否在褐飞虱适应水稻抗性品种的过程中发挥作用也有待探明。

本研究根据转录组获得预测编码 PI3K p85α 的核心序列信息入手,应用 RACE 法获得该基因的全长 cDNA 序列。利用荧光定量 PCR 技术检测 *NlPIK3R*1 基因在褐飞虱不同发育期的表达量,并通过 RNA 干扰技术研究该基因在褐飞虱中的作用,以期为褐飞虱防治提供新的靶标。

1　材料和方法

1.1　供试褐飞虱

供试褐飞虱采集于浙江省杭州周边稻田(30°N,120°E),种群在感虫水稻品种 TN1 上连续饲养 20 代以上,饲养温度为 26 ± 2℃,相对湿度为80% ± 5%,光周期为 16L∶8D。

1.2　供试主要试剂

RNA 提取试剂 TRIZOL® Reagent (Invitrogen)、RACE 试剂盒 BD SMART™ RACE Amplification Kit (Clontech)、凝胶回收试剂盒 DNA Gel Extraction Ki (Axygen)、反转录试剂盒 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser 和荧光定量 PCR 试剂 SYBR *Premix EX Taq* 购自 TaKaRa 公司;PCR 试剂盒 Taq PCR Master Mix 购于生工生物工程(上海)有限公司;体外转录试剂盒 MEGAscript® T7 High Yield Transcription Kit(Ambion)。

1.3　褐飞虱 *NlPIK3R*1 基因核心片段的克隆及验证

根据前期的转录组序列信息,获得褐飞虱 *NlPIK3R*1 基因的核心序列,经 NCBI 网站序列进行比对鉴定。应用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 NlPIK3R1-F 和 NlPIK3R1-R(表 1),对序列进行验证。取褐飞虱雌雄成虫各 5 头,按照 Invitrogen 公司的 TRIZOL® Reagent 试剂说明书进行总 RNA 的抽

提,使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量,以及使用 Nanodrop2000（Thermo, USA）测定 RNA 的纯度和浓度。按照反转录试剂盒操作说明,获得的 cDNA 产物为 PCR 扩增模板。PCR 扩增采用 50 μL 反应体系,其中包括 PCR Mix 25 μL,10 μmol/L 正反引物各 2 μL,模板 2 μL,ddH_2O 19 μL。PCR 反应程序为:94℃ 4 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 3 min, 30 个循环;72℃ 10 min;4℃保存。PCR 扩增得到的产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,按 AxyPrep™ DNA Gel Extraction Kit 试剂盒说明书回收目的片段,连接到载体 pMD-18T（TaKaRa, Japan）4℃过夜,转化到 JM109 感受态细胞中加 1 mL LB 液体培养基 37℃摇床培养 2 h,取 200 μL 菌液涂布在含有 1% Amp 的 LB 固体培养基 37℃倒置培养 9 h,随机挑取 5 个单菌落于含 1% Amp 的 LB 液体培养基 1 mL 的 1.5 mL 离心管中 37℃摇床培养 12 h,取 1 μL 菌液进行菌液 PCR 鉴定阳性克隆菌株并送到上海桑尼生物科技有限公司测序。测序结果用 DNAMAN 软件和原序列比对验证。

1.4　褐飞虱 *NlPIK3R*1 基因全长的克隆

根据褐飞虱 *NlPIK3R*1 基因核心序列信息,采用 RACE 法克隆基因全长。取不同日龄的褐飞虱雌雄成虫各 5 头为样本,总 RNA 的抽提及质量检测同上按照 BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 说明书合成 5′-RACE 和 3′-RACE 的模板。分别设计外引物 5O-PIK3R1 和 3O-PIK3R1（表 1）,以及内引物 5I-PIK3R1 和 3I-PIK3R1（表 1）。

采用巢式 PCR 对目的基因的两端进行扩增,扩增体系同上。PCR 反应程序为:外围 PCR 反应条件:94℃ 4 min;94℃ 30 s,63℃ 30 s,72℃ 3 min, 30 个循环;72℃ 10 min;4℃保存。内围 PCR 所用的模板为第一轮 PCR 得到的产物。内围 PCR 反应条件:94℃ 4 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 3 min, 30 个循环;72℃ 10 min;4℃保存。电泳,胶回收,连接,转化等同上。

表 1　基因克隆、荧光定量 PCR 及合成 dsRNA 的引物

Table 1　Primers used in gene cloning, real-time PCR and the synthesis of dsRNA

引物用途 Use of primers	引物名称 Primer name	引物序列（5′－3′） Primer sequence
cDNA 克隆 cDNA cloning	NlPIK3R1-F	ATCGCAGTGGCAAGTACGGA
	NlPIK3R1-R	GTGTTGTTGATGTTGCCCAGGTT
	5O-PIK3R1	CGGTGGAGGTTGAGATTGGATT
	5I-PIK3R1	AACTGCTGGGACGAACAAG
	3O-PIK3R1	TCGTGCCATTGAACGGGAGA
	3I-PIK3R1	CCCGCACTGATGCTGAG
	PIK3R1-FL-F	ACATGGGGAGTCCGGTCATAGTGCT
	PIK3R1-FL-R	ATTGATGTTGCCATCACTAGTAGT
荧光定量 PCR Real-time PCR	QPIK3R1-F	TGTTCGTCCCAGCAGTTCG
	QPIK3R1-R	TCGGTGGAGGTTGAGATTG
	QActin-F	TGCGTGACATCAAGGAGAAGC
	QActin-R	CCATACCCAAGAAGGAAGGCT
dsRNA 合成 dsRNA synthesis	dsPIK3R1-F	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGTGCCATTGAACGGGAGA
	dsPIK3R1-R	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGACGAACTGCTGGGACGAA
	dsGFP-F	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGATACGTGCAGGAGAGGAC
	dsGFP-R	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGCAGATTGTGTGGACAGG

根据测序结果用 DNAMAN 软件拼接得到序列全长,并设计全长验证引物 PIK3R1-FL-F 和 PIK3R1-FL-R（表 1）对拼接的全长序列进行验证。

1.5　褐飞虱 *NlPIK3R*1 基因表达分析

分别对饲养在 TN1 上褐飞虱按照 1－2 龄若虫（50 头）、3－4 龄若虫（20 头）、5 龄若虫（10 头）、刚羽化雌成虫（10 头）、怀卵雌成虫（10 头）和雄成虫（10 头）进行取样,用荧光定量 PCR 进行基因表达量检测分析,重复 3 次。总 RNA 的提取及 cDNA 模板合成同上。荧光定量 PCR 特异性引物为 QPIK3R1-F 和 QPIK3R1-R（表 1）,荧光片段经过测序和原序列比对,以 *β-actin* 基因为内参（Chen *et al.*, 2010）,检测褐飞虱 *NlPIK3R*1 基因的相对表达量。荧光定量 PCR 参考马艳等(2013)的反应体系及方法,其中退火温度改为 58℃。

1.6　dsRNA 的合成

根据 cDNA 全长序列设计用于合成 dsRNA 干扰片段的引物 dsPIK3R1-F 和 dsPIK3R1-R（表 1）,

ds*GFP*、引物修饰及 dsRNA 模板的制备参照马艳等（2013）。按照 MEGAscript® T7 High Yield Transcription Kit 试剂盒说明书合成 dsRNA。

1.7 RNAi 实验

在水稻品种 TN1 取 2 龄褐飞虱若虫进行人工饲养，饲养条件参照 Fu 等（2001）的营养液配方和饲喂装置，等若虫发育至 5 龄时进行 RNA 干扰处理。RNA 干扰设置 2 个浓度：低浓度组（L）为 0.1 μg/μL ds*NlPIK3R*1，高浓度组（H）为 0.5 μg/μL ds*NlPIK3R*1，同时设置喂食纯营养液作为空白对照组（CK），喂食含 0.5 μg/μL ds*GFP* 的营养液作为 ds*GFP* 对照组（ds*GFP*）。处理时，每饲喂装置放入 20 头发育一致的 5 龄雌性褐飞虱若虫，设置 3 个重复，每天更换取食液，清理和统计死亡的褐飞虱及其羽化蜕下的皮，当空白对照组开始出现有羽化个体时，开始对各组进行存活率、羽化率等的统计，并在喂食后第 7 天对各组进行称重。

此外，设置平行的 RNAi 实验组，当空白对照组出现羽化个体时，在第 1，3，5 和 7 天对各组分别进行取样，每组 3 头，并进行 RNA 的抽提及后续 *NlPIK3R*1 基因表达量的荧光定量 PCR 检测。

1.8 数据统计与分析

采用 Excel 2010 软件进行数据整理，运用 SPSS16.0 独立样本 *T* 检验进行显著性差异分析。

2 结果

2.1 褐飞虱 *NlPIK3R*1 基因的 cDNA 全长克隆及序列分析

以褐飞虱 cDNA 为模板，对 *NlPIK3R*1 的核心片段进行 PCR 扩增，得到一条与预期长度相符的特异性条带，测序结果表明该片段大小为 1 087 bp，并通过序列比对发现与转录组所得该序列一致。Blast X（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）比对发现，克隆的片段与人体虱 *Pediculus humanus corporis* 的 PI3K 的调节亚基 p85α 氨基酸序列一致性为 59%，表明该片段为褐飞虱编码 p85α 的核心片段。应用 RACE 法扩增该基因的 cDNA 全长，获得 5′端序列 2 300 bp 和 3′端序列 464 bp。用 DNAMAN 进行序列拼接得到 *PIK3R*1 基因全长为 2 694 bp（图 1），拼接得到的全长序列经两端 PCR 和测序得到准确验证，并与公布的褐飞虱基因组序列信息（Xue *et al*., 2014）比对，发现 *NlPIK3R*1 基因位于 scaffold408（GenBank 登录号：KN152346.1）上，分析显示 *NlPIK3R*1 基因有 12 个外显子和 11 个内含子（图 2）。

利用 ORF Finder（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/）分析，*NlPIK3R*1 基因 cDNA 全长包含了 94 bp 的 5′非编码区（5′UTR），2 526 bp 开放阅读框（ORF）和 75 bp 的 3′非编码区（3′UTR），3′端具有典型的 polyA 结构。*NlPIK3R*1 基因共编码 841 个氨基酸（图 1），利用蛋白分子量及等电点预测工具（http://web.expasy.org/compute_pi/），预测得到该蛋白分子量为 95.6 kDa，等电点为 5.84。通过蛋白结构域预测站网（http://smart.embl-heidelberg.de/）预测发现该蛋白具有山姆结构（sterile alpha motif, SAM）、蛋白激酶 C 保守区域 1（protein kinase C conserved region 1 domains, C1）、RhoGTP 酶激活蛋白结构域（GTPase-activator protein for Rho, RhoGAP）和 2 个 Src 同源结构域（Src homology 2 domains, SH2）（图 3）。类比赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*（GenBank 登录号：XP_008193465.1, 54%）和顶切叶蚁 *Acromyrm exechinatior*（EGI59407.1, 57%）的 PI3K p85α 发现它们都有共同的结构域（图 3）。

利用膜翅目、鞘翅目和等翅目的 9 种昆虫的 p85α 氨基酸序列与褐飞虱 p85α 氨基酸序列用邻接法（neighbor-joining, NJ）构建系统进化树。进化树分析表明褐飞虱为单独的一类（图 4）。

2.2 褐飞虱 *NlPIK3R*1 的表达变化分析

荧光定量 PCR 检测表明，*NlPIK3R*1 基因在褐飞虱所有龄期和不同性别的褐飞虱中均有不同程度表达。在怀卵雌虫时，*NlPI3KR*1 基因表达量急剧增加并达到最高，而在其他发育阶段和雄成虫中表达量都很低（图 5）。

2.3 RNAi 对褐飞虱 *NlPIK3R*1 mRNA 表达水平的影响

荧光定量 PCR 检测结果显示，ds*GFP* 对照组和空白对照组的 *NlPIK3R*1 mRNA 表达量没有显著差异，并且这两个对照组的 mRNA 表达量均随着羽化后的时间的增加而增加。低浓度干扰组中，褐飞虱 *NlPIK3R*1 mRNA 也随着羽化后的时间而增加，在 5 d 时达到最高值，第 7 天时开始下降，并且相较于空白对照组和 ds*GFP* 对照组其表达量显著降低（图 6：A）。而高浓度的 *dsNlPIK3R*1 干扰，在第 1 天时即有效的抑制了褐飞虱 *NlPIK3R*1 mRNA 的表达（$P < 0.01$），其 mRNA 的表达量一直处于比较低的状态，而在第 7 天时，由于该组用于取样的褐飞虱全部死亡，因而无法得到相应的 mRNA 表达量数据，这也说明高浓度的 *NlPIK3R*1 干扰对褐飞虱影响很大。

```
1      acatggggagtccggtcatagtgcttctccgagacgcttgtgtcgactcactcagtctcaactcaaatttattctttttcatgctaatc
91     aaaaATGTCGCCTCCTATTAGTTTTTCGCTACAACAGCTACAGCTGGAACTGGCCTACGTACTTTTCAAGCCGATAACAGAGTGGACATC
1          M  S  P  P  I  S  F  S  L  Q  Q  L  Q  L  E  L  A  Y  V  L  F  K  P  I  T  E  W  T  S
181    TGCCAATGTGGTTGAGTGGATGGCCGCTCTCAACCTATACCGCTACGCGGATGTATTCAAATCCAAAGACATCAAAGGATCAGATCTTCT
30      A  N  V  V  E  W  M  A  A  L  N  L  Y  R  Y  A  D  V  F  K  S  K  D  I  K  G  S  D  L  L
271    GAATTTGGACCGTGACAAACTGATGAACATGGGCATCAAAGATGAGTTTCATCTGAAAGCCATTCTGGTGTGCATTGACGAGTTATGCCG
60      N  L  D  R  D  K  L  M  N  M  G  I  K  D  E  F  H  L  K  A  I  L  V  C  I  D  E  L  C  R
361    CAAAGGAAGTGACATGCAGAATGAGTCTGGCATGGAAAACAGCGCAGCCGCATCTGATCATTACCTCAGAAAGCATAGTTTCTCGACTCT
90      K  G  S  D  M  Q  N  E  S  G  M  E  N  S  A  A  A  S  D  H  Y  L  R  K  H  S  F  S  T  L
451    GGAACGCTGTGACAAGTGCCACAAATACCTGAGAGGTTTATCACATCAGGGTAACATCTGTCAAGATTGCGGACTAGTGGCTCACCGCAC
120     E  R  C  D  K  C  H  K  Y  L  R  G  L  S  H  Q  G  N  I  C  Q  D  C  G  L  V  A  H  R  T
541    TTGCTCGGCAACTGGACTGCCACCTTGCTTGCCTCCTGGCATTGGAGCTGAGCGCCATGCTAGAAGCCCATTCTGTTCCGTATTTGGCCT
150     C  S  A  T  G  L  P  P  C  L  P  P  G  I  G  A  E  R  H  A  R  S  P  F  C  S  V  F  G  L
631    GGGTCTGTGCGGCCAATTCAACACCAAAGGTCAGCCGGCTTCCTACCTTGTGATCCGCTGTGCTGAAGAAATCGAGGCCAGAGCCAAGTC
180     G  L  C  G  Q  F  N  T  K  G  Q  P  A  S  Y  L  V  I  R  C  A  E  E  I  E  A  R  A  K  S
721    ACTTCCCAGTCTCGACCTCTACAAGATGTATCGCTCATCACCACCCCCCGATAAAGTTGATGAACTCCGCACCAAATTCAACGAGGCTGA
210     L  P  S  L  D  L  Y  K  M  Y  R  S  S  P  P  P  D  K  V  D  E  L  R  T  K  F  N  E  A  E
811    AGATATTACTGCATTAGATCTGTCAGCATACGAGCCTAACTGCATCACCAACATCCTCAACAAATATCTCAGAGAACTTCCTGATCCTGT
240     D  I  T  A  L  D  L  S  A  Y  E  P  N  C  I  T  N  I  L  N  K  Y  L  R  E  L  P  D  P  V
901    CATTCCTGTGCAGTGGTATGACAGATTCCTAGAGGCTTCAAGAGTTTGCAATGATGATGAGCAGTGCAGTGTGTGCCTGATGCAACTAGT
270     I  P  V  Q  W  Y  D  R  F  L  E  A  S  R  V  C  N  D  D  E  Q  C  S  V  C  L  M  Q  L  V
991    CCAAGAACTGCCTGAACAGCACAAATCAACTCTCACCTACCTGATGGCTCATCTTTGCCGCATTTGTCAGATGCAGTACAGTCGCGGAAT
300     Q  E  L  P  E  Q  H  K  S  T  L  T  Y  L  M  A  H  L  C  R  I  C  Q  M  Q  Y  S  R  G  I
1081   CAAGGAAGCGCCCACAATCCTCATTCAAGTTCTCTGCCATATTTTCTTGCGGCCTCCTTGGGAAAGTATCATCCAAGTGGTGTACAACAC
330     K  E  A  P  T  I  L  I  Q  V  L  C  H  I  F  L  R  P  P  W  E  S  I  I  Q  V  V  Y  N  T
1171   CGAATCGCACATCAGAATCATGGAGTTGCTGCTGCTTCATGGCGACTGGGGCGAGAAGTTACCCGAATTTGCATCCGCACCTGCGCTGCC
360     E  S  H  I  R  I  M  E  L  L  L  L  H  G  D  W  G  E  K  L  P  E  F  A  S  A  P  A  L  P
1261   CCCTCGAAAGTTGTCGCGTCTCGCTCCGGCCTGCGCCATTCAGATGCTCACTGAAATGGACCCCCCTGCACCCGACGAGATGCACAGCAA
390     P  R  K  L  S  R  L  A  P  A  C  A  I  Q  M  L  T  E  M  D  P  P  A  P  D  E  M  H  S  N
1351   CAAACTGAGCGATGCCGAGTGGTACTGGGGCGATATCACTCGTGATGAAGTGAATGAAAAGTTGATGGATACTCCAGACGGTACTTTCTT
420     K  L  S  D  A  E  W  Y  W  G  D  I  T  R  D  E  V  N  E  K  L  M  D  T  P  D  G  T  F  F
1441   CGTACGAAACGCATCAACAAAATCTGGAGAATACACTCTCACCCTGCGCAAAGGTGGCTCAAGCAAATTGATCAAAATTTCTCATCGCAG
450     V  R  N  A  S  T  K  S  G  E  Y  T  L  T  L  R  K  G  G  S  S  K  L  I  K  I  S  H  R  S
1531   TGGCAAGTACGGATTTTCTGAGCCATTCAAGTTCAACACAGTTGTTGAACTAGTCAATTTCTATCGGAATGTATCGCTGGCGCAATACAA
480     G  K  Y  G  F  S  E  P  F  K  F  N  T  V  V  E  L  V  N  F  Y  R  N  V  S  L  A  Q  Y  N
1621   CGCCACGCTTGACATCAAGCTGCTGTATCCTGTGTCACGTTTTCAACAGGAGGAAGAAATTGCCAGCTCCAGTGACATCGAAAAGGTTGC
510     A  T  L  D  I  K  L  L  Y  P  V  S  R  F  Q  Q  E  E  E  I  A  S  S  S  D  I  E  K  V  A
1711   TACAAAACTGTTGGAGATACATGATACCTATGTGGCCAAAACCAAGCAGTATGATGAGTACTCCGAAGAATTCGAGAACATCAACAAAGA
540     T  K  L  L  E  I  H  D  T  Y  V  A  K  T  K  Q  Y  D  E  Y  S  E  E  F  E  N  I  N  K  E
1801   GATCAATTTGAAGCGTCAAGCTCTGGATGCGTTCATTGAAACCGTCATCATGTTCGAAGATCAAATCAAACTGCAGGAGCGCTTCCAGAA
570     I  N  L  K  R  Q  A  L  D  A  F  I  E  T  V  I  M  F  E  D  Q  I  K  L  Q  E  R  F  Q  K
1891   GGAAGCACAACCTCATGAGGTTAAAAGTCTGATGGAGAACTCTGAGATCCTGAAATTGCGCCTGAAATCAATGAACGAAAGCAGAAAAAC
600     E  A  Q  P  H  E  V  K  S  L  M  E  N  S  E  I  L  K  L  R  L  K  S  M  N  E  S  R  K  T
1981   GTTGGAAGACAGCTTGAATCAGCAGGTGGCGTTCAGTCGTGCCATTGAACGGGAGATGCAAGCTCTGAAACCAGAGGTGATTCAGTTGTT
630     L  E  D  S  L  N  Q  Q  V  A  F  S  R  A  I  E  R  E  M  Q  A  L  K  P  E  V  I  Q  L  F
2071   CCGCCAGAAGGAGAAGCATGTGGCCTGGTTGGTGTCTCGCGGTGTCAAGCAGAACCGACTCATGCAGTTGCTCCAGTCCGGCGGCGGTGT
660     R  Q  K  E  K  H  V  A  W  L  V  S  R  G  V  K  Q  N  R  L  M  Q  L  L  Q  S  G  G  G  V
2161   AAGGGCTCTGGTGCTGGGGGTTGAGGACTTGCCTCATCAGGATGAACTCACTTGGCTCCTCAACGAGTGTTCCCGCACTGATGCTGAGCA
690     R  A  L  V  L  G  V  E  D  L  P  H  Q  D  E  L  T  W  L  L  N  E  C  S  R  T  D  A  E  Q
2251   GTACCTGGCTGGTAAAAAGGATGGAACGTTCCTTGTTCGTCCCAGCAGTTCGGGCCAATATGCTCTGTCTATTGCATGCAATGGAATTAC
720     Y  L  A  G  K  K  D  G  T  F  L  V  R  P  S  S  S  G  Q  Y  A  L  S  I  A  C  N  G  I  T
2341   AAATCACTGCATCATCTACAAAACAAAGCGCGGTTACGGGTTTGCAGAGCCTTACAACATATACGAGTCGCTCAAAGCTCTGGTCATCCA
750     N  H  C  I  I  Y  K  T  K  R  G  Y  G  F  A  E  P  Y  N  I  Y  E  S  L  K  A  L  V  I  H
2431   TTACGCGCAGAACTCTCTGGAGGAGCACAATGACTCGTTGACCACAAACTTGGCATTTCCGGTGTTCGCACCTCCCAATCCAATCTCAAC
780     Y  A  Q  N  S  L  E  E  H  N  D  S  L  T  T  N  L  A  F  P  V  F  A  P  P  N  P  I  S  T
2521   CTCCACCGACCAAAATGACAACAGCAACAACAACAGCGTCACCGTCCCTCCCCTGCTCGGCTACATCAACCTGGGCAACATCAACAACAC
810     S  T  D  Q  N  D  N  S  N  N  N  S  V  T  V  P  P  L  L  G  Y  I  N  L  G  N  I  N  N  T
2611   TCACTACTAGtgatggcaacatcaacaacattcactactagtgatggcaacatcaataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
840     H  Y  *
```

图 1　褐飞虱 *NlPIK3R*1 基因全长 cDNA 序列及氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide sequence and amino acid sequence of *NlPIK3R*1 from *Nilaparvata lugens*

起始密码子和终止密码子用粗体标识；加尾信号（aataaa）用阴影标识。The start and stop codons are in boldface, and the polyadenylation signal sequence (aataaa) is shown in shadow.

2.4　RNAi 对褐飞虱存活率的影响

在 RNA 干扰实验中，连续喂养 ds*NlPIK3R*1 对褐飞虱存活率产生了较为明显的影响，从第 2 天开始，喂食 ds*NlPIK3R*1 的 2 个实验组与对照组就达到了极显著的差异，高浓度处理组的 ds*NlPIK3R*1 干扰对褐飞虱的存活率影响尤其明显，在统计第 7 天时的存活率仅为 37.50%，相比于空白对照组 87.00% 和 ds*GFP* 对照组 76.67% 均达到了极显著差异

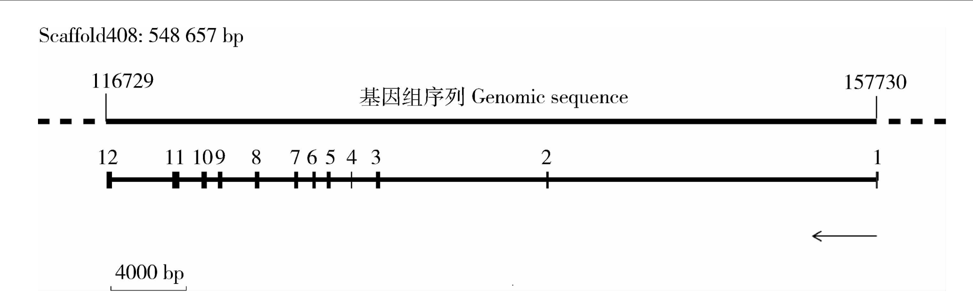


图 2 褐飞虱 *NlPIK3R1* 基因结构

Fig. 2 Gene structure of *NlPIK3R1* from *Nilaparvata lugens*

箭头指示基因转录的方向，数字 1～12 表示外显子。The arrow indicates the direction of gene transcription and the numbers 1 to 12 represent exons.

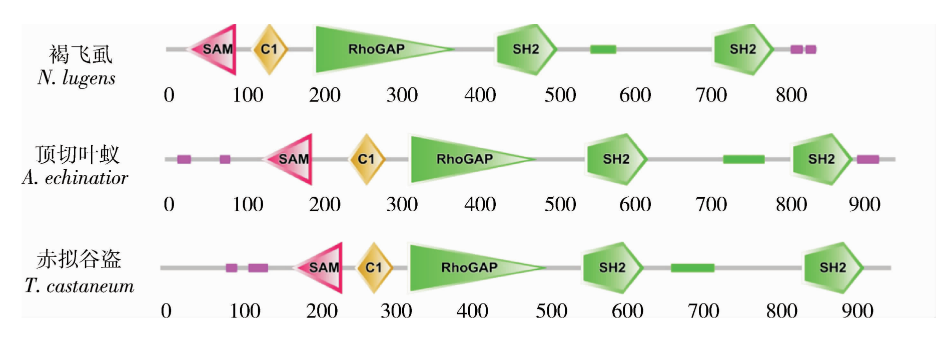


图 3 褐飞虱、赤拟谷盗和顶切叶蚁 p85α 结构图

Fig. 3 Secondary structure of p85α from *Nilaparvata lugens*, *Tribolium castaneum* and *Acromyrmex echinatior*

SAM：山姆结构 Sterile alpha motif；C1：蛋白激酶 C 保守区域 1 Protein kinase C conserved region 1 domains；RhoGAP：RhoGTP 酶激活蛋白结构域 GTPase-activator protein for Rho；SH2：Src 同源结构域 Src homology 2 domains. 绿色带状区域代表卷曲螺旋区域；粉红色带状区域代表低度复杂区域。The green band represents coiled coil domains, while the pink band represents low complexity domains.

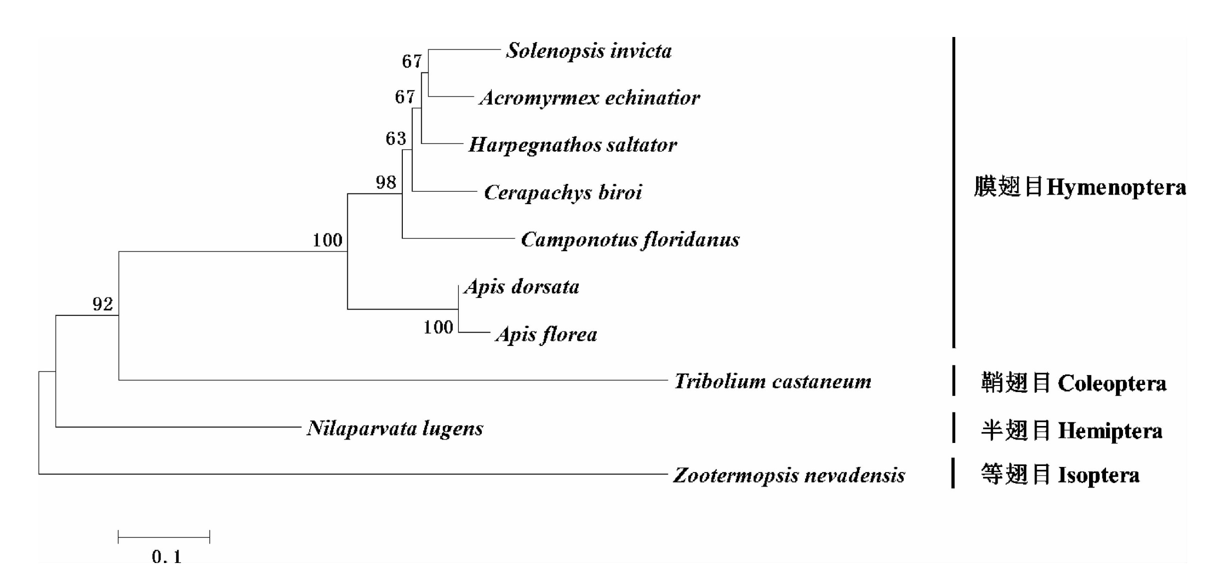


图 4 基于氨基酸序列构建的褐飞虱及其他昆虫 p85α 的进化树(邻接法)

Fig. 4 Phylogenetic relationship of p85α from *Nilaparvata lugens* and other insects based on amino acid sequence with the neighbor-joining method

p85α 的来源及其 GenBank 登录号 Origin species of p85α proteins and their GenBank accession numbers：大蜜蜂 *Apis dorsata* (XP_006619973.1)；小蜜蜂 *Apis florea* (XP_003691681.1)；佛罗里达弓背蚁 *Camponotus floridanus* (EFN63874.1)；顶切叶蚁 *Acromyrmex echinatior* (EGI59407.1)；行军蚁 *Cerapachys biroi* (EZA49782.1)；褐飞虱 *Nilaparvata lugens* (KP635379)；赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* (XP_008193465.1)；红火蚁 *Solenopsis invicta* (XP_011159181.1)；印度跳蚁 *Harpegnathos saltator* (XP_011154875.1)；内华达古白蚁 *Zootermopsis nevadensis* (KDR18118.1). 分支节点上的数字表示 1 000 次自举检验得到的 Bootstrap 值；比例尺表示每个位点的氨基酸替换数。Numbers on the branch node indicates the Bootstrap values from of 1 000 replicates. The bar indicates the estimated number of substitutions per site.

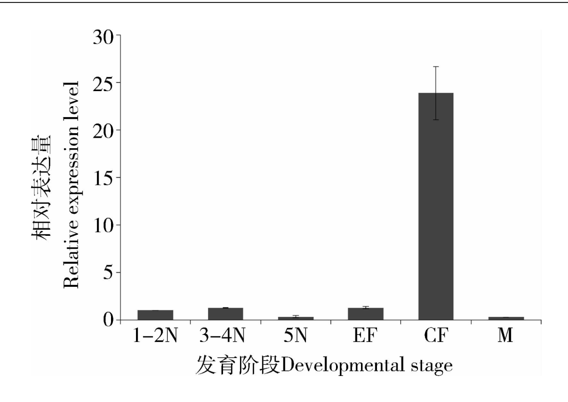
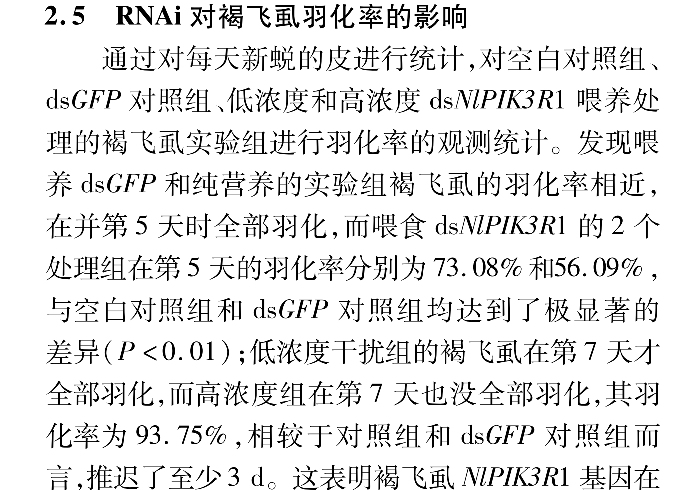


图 5　褐飞虱不同发育阶段 *NlPIK3R*1 表达量的变化

Fig. 5　Expression level of *NlPIK3R*1 in different developmental stages of *Nilaparvata lugens*

1 - 2N：1 - 2 龄褐飞虱若虫 1st - 2nd instar nymph；3 - 4N：3 - 4 龄褐飞虱若虫 3rd - 4th instar nymph；5N：5 龄褐飞虱若虫 5th instar nymph；EF：刚羽化的雌性褐飞虱 Newly eclosed female adult；GF：怀卵褐飞虱 Gravid female adult；M：雄成虫 Male adult.

($P<0.01$)（图 6：B）。有趣的是，连续喂食 ds*NlPIK3R*1 对羽化 4 d 左右的褐飞虱有致命性的影响，致使实验组仅有尚未羽化或羽化早期的褐飞虱存活。连续喂养 ds*GFP* 对褐飞虱的存活率也有一定的影响，但是相较于喂食营养液没有显著差异。由此可见，*NlPIK3R*1 基因对褐飞虱的生存具有重要的影响，特别是对怀卵阶段的褐飞虱影响最为明显。



2.5　RNAi 对褐飞虱羽化率的影响

通过对每天新蜕的皮进行统计，对空白对照组、ds*GFP* 对照组、低浓度和高浓度 ds*NlPIK3R*1 喂养处理的褐飞虱实验组进行羽化率的观测统计。发现喂养 ds*GFP* 和纯营养的实验组褐飞虱的羽化率相近，在并第 5 天时全部羽化，而喂食 ds*NlPIK3R*1 的 2 个处理组在第 5 天的羽化率分别为 73.08% 和56.09%，与空白对照组和 ds*GFP* 对照组均达到了极显著的差异($P<0.01$)；低浓度干扰组的褐飞虱在第 7 天才全部羽化，而高浓度组在第 7 天也没全部羽化，其羽化率为 93.75%，相较于对照组和 ds*GFP* 对照组而言，推迟了至少 3 d。这表明褐飞虱 *NlPIK3R*1 基因在一定程度上调控褐飞虱的发育(图 6：C)。

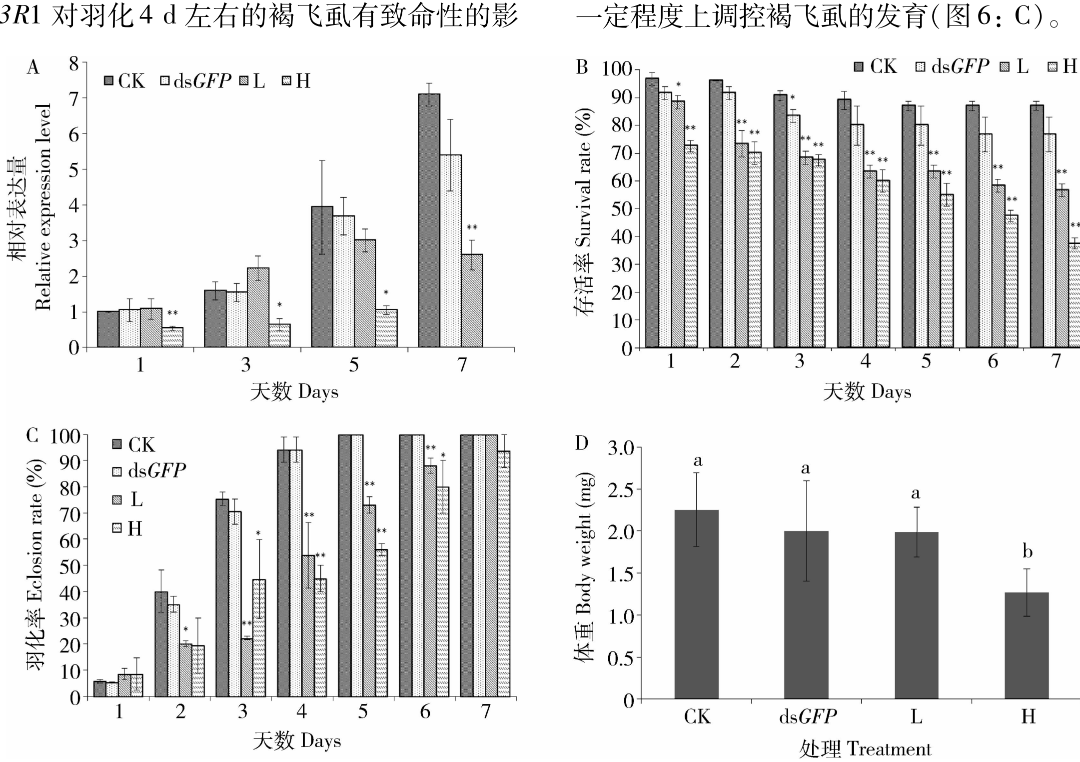


图 6　褐飞虱成虫取食 ds*NlPIK3R*1 对其 *NlPIK3R*1 基因表达量(A)、存活率(B)、羽化率(C)和体重(D)的影响

Fig. 6　Expression level of *NlPIK3R*1 (A), survival rate (B), eclosion rate (C) and body weight (D) of *Nilaparvata lugens* adults fed with ds*NlPIK3R*1

L：低浓度 ds*NlPIK3R*1(0.1 μg/μL)喂养的实验组 The group fed with low concentration of ds*NlPIK3R*1 (0.1 μg/μL)；H：高浓度 ds*NlPIK3R*1 (0.5 μg/μL)喂养的实验组 The group fed with high concentration of ds*NlPIK3R*1 (0.5 μg/μL). 以 ds*GFP* 作为阴性对照；图中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准差，柱上单星号示空白对照组与该组之间存在显著差异(T 检验，$P<0.05$)；双星号表示与空白对照组(CK)之间存在极显著差异(T 检验，$P<0.01$)；不同小写字母代表不同组之间存在显著差异(T 检验，$P<0.05$)。ds*GFP* was used as the negative control. Data in the figure are represented as mean ± *SD* of three independent experiments with twenty individuals each. Single asterisk and double asterisks mean significant difference from the blank control group (CK) at the 0.05 and 0.01 level, respectively (T-test). Different lowercase letters indicates significant difference at the 0.05 level between different groups (T-test).

2.6 RNAi 对褐飞虱体重的影响

在第 7 天分别对各组中存活的褐飞虱进行称重统计和分析。空白对照组、ds*GFP* 对照组和喂食低浓度 ds*NlPIK3R*1 的实验组中褐飞虱的体重没有明显区别，个体平均体重均在 2.00 mg 以上，而喂食高浓度的 ds*NlPIK3R*1 实验组中褐飞虱个体平均体重为 1.27 mg，与其他几组相比存在着显著的差异（$P < 0.05$），说明高浓度的干扰对褐飞虱的生长有很好的抑制效果（图 6：D）。

3 讨论

本研究克隆了褐飞虱 I 型 PI3K 调节亚基 p85α 的编码基因 *NlPIK3R*1 的全长 cDNA。通过该基因编码的氨基酸序列同源比对分析发现，在不同昆虫中该基因的保守性比较差，但在编码主要结构域的区域则有较高的同源性，这说明在长期的进化过程中，不同昆虫的调节亚基 p85α 在 PI3K 中仍保留相同的功能，也证明了 *PIK3R*1 基因对褐飞虱正常的生长发育有着重要作用。

*NlPIK3R*1 基因在褐飞虱所有龄期和不同性别的褐飞虱中均有表达，尤其在怀卵雌虫中大量表达，表明怀卵期是 *NlPIK3R*1 基因发挥功能的一个重要时期。在褐飞虱怀卵阶段，主要涉及褐飞虱腹部脂肪体的大量合成及卵巢的发育等，这与果蝇怀卵过程相似，而 Edgar 发现通过激活果蝇 PI3K 信号通路能促使果蝇的上皮组织和脂肪体细胞生长速度加快，增加细胞的大小。同时，他们也通过抑制实验得到了相对应的结果（Britton *et al*., 2002）。因此，我们推测 *NlPIK3R*1 基因在怀卵褐飞虱中高表达可能与褐飞虱脂肪体细胞生长和卵巢发育等有关。为此，我们试图考察 *NlPIK3R*1 干扰对褐飞虱脂肪体细胞生长和卵巢发育的影响，然而，进一步的观察发现，喂食低浓度实验组褐飞虱的体型与空白对照组和 ds*GFP* 对照组无明显区别，而连续喂食高浓度 ds*NlPIK3R*1 对羽化 4 d 左右的褐飞虱有致命性的影响，饲喂装置中仅剩下尚未羽化或羽化初期（2－3 d 左右）卵巢发育不明显的褐飞虱，因而无法从实验组取到怀卵的褐飞虱样本，致使有关 *NlPIK3R*1 的 RNA 干扰对褐飞虱卵巢发育等影响的信息尚不明确，这也从侧面说明了该基因对褐飞虱卵巢发育等的重要性。

研究证实 insulin/PI3K/Akt 信号通路在许多生物体中的功能是保守的，控制着生物体的多种生理机能，包括糖和脂质代谢，组织的生长以及生物体寿命的长短等（Luckhart and Riehle, 2007; Sim and Denlinger, 2009; Teleman, 2010; Ma *et al*., 2014）。在本研究中，喂食 ds*NlPIK3R*1 对褐飞虱的 *NlPIK3R*1 基因表达量产生了明显的抑制效果，其中，高浓度处理对靶标基因的抑制效果尤为明显，可以使 *NlPIK3R*1 基本处于很低的表达水平，并导致成虫羽化时间推迟和体重减轻。与此类似，Shioi 等（2000）通过转基因技术构建了心脏 PI3K 突变的小鼠，发现 PI3K 高表达的突变小鼠的心脏和心肌细胞明显比受到抑制的小鼠大得多。Stocker 和 Hafen（2000）通过对果蝇的研究也发现 PI3K 通路中 PtdIns(3,4,5)P3 表达量的高低对果蝇体型大小影响很大。这些都说明了 PI3K 通路对生物体的生长发育起着重要的调控作用。

*NlPIK3R*1 基因的 RNA 干扰显示，空白对照组和 ds*GFP* 对照组无论从 *NlPIK3R*1 基因的表达量，还是褐飞虱的羽化率、存活率及体重方面都没有明显的差异，说明非靶向的双链 RNA 溶液体系对褐飞虱本身没毒性，这与张倩等（2012）在研究灰飞虱中得出的结论一致。但是，靶向 *NlPIK3R*1 的 RNA 干扰则表现为对褐飞虱的生存有一定的影响，并且处理浓度越高，导致的褐飞虱死亡率也越高。4E-BP 是 PI3K/TOR 通路的下游效应蛋白分子，在营养充足时，PI3K/TOR 通路激活，促进 4E-BP 磷酸化，进而使得 4E-BP 不能和 eIF4E 结合，从而引起蛋白翻译上调（Schmelzle and Hall, 2000; Hay and Sonenberg, 2004）。Tettweiler 等（2005）发现 d4E-BP 无效突变可以导致雌果蝇的寿命显著缩短。本研究中通过抑制上游 *NlPIK3R*1 基因影响了褐飞虱生长发育及死亡，可能通过降低 4E-BP 磷酸化水平，使得蛋白翻译下调，进而影响了褐飞虱的正常生命活动。

本研究初步探明了 *NlPIK3R*1 基因在褐飞虱生存及生长发育等方面的作用，但是该基因具体的调控机制和涉及的相关上下游基因在褐飞虱中还不是很明确。今后，进一步探索 *NlPIK3R*1 通路的重要基因及其调控机制，对于发现更多新的重要基因，从中筛选更为有效的靶标来防治褐飞虱具有重要意义。

参考文献（References）

Backer JM, 2008. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem. J*., 410(1): 1－17.

Bottrell DG, Schoenly KG, 2012. Resurrecting the ghost of green

revolutions past: the brown planthopper as a recurring threat to high-yielding rice production in tropical Asia. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 15(1): 122 - 140.

Britton JS, Lockwood WK, Li L, Cohen SM, Edgar BA, 2002. *Drosophila*' s insulin/PI3-kinase pathway coordinates cellular metabolism with nutritional conditions. *Developmental Cell*, 2(2): 239 - 249.

Chen J, Zhang D, Yao Q, Zhang J, Dong X, Tian H, Zhang W, 2010. Feeding-based RNA interference of a *trehalose phosphate synthase* gene in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Molecular Biology*, 19(6): 777 - 786.

Fu Q, Zhang Z, Hu C, Lai F, Sun Z, 2001. A chemically defined diet enables continuous rearing of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae). *Applied Entomology and Zoology*, 36(1): 111 - 116.

Hay N, Sonenberg N, 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development*, 18(16): 1926 - 1945.

Jean S, Kiger AA, 2014. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *Journal of Cell Science*, 127(5): 923 - 928.

Liu S, Liang QM, Zhou WW, Jiang YD, Zhu QZ, Yu H, Zhang CX, Gurr GM, Zhu ZR, 2014. RNA interference of NADPH-cytochrome P450 reductase of the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*, increases susceptibility to insecticides. *Pest Management Science*, 71(1): 32 - 39.

Luckhart S, Riehle MA, 2007. The insulin signaling cascade from nematodes to mammals: insights into innate immunity of *Anopheles* mosquitoes to malaria parasite infection. *Developmental & Comparative Immunology*, 31(7): 647 - 656.

Ma L, Zhao ZW, Wang R, Zhang X, Zhang JY, Dong W, Xu BL, Zhang JS, 2014. Caloric restriction can improve learning ability in C57/BL mice via regulation of the insulin-PI3K/Akt signaling pathway. *Neurological Sciences*, 35(9): 1381 - 1386.

Ma Y, Hao PY, Lu CF, Yu XP, 2013. Molecular cloning and function analysis of cuticular protein gene *NlICP* in the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 56(11): 1244 - 1251. [马艳, 郝培应, 陆潮峰, 俞晓平, 2013. 褐飞虱表皮蛋白基因 *NlICP* 的克隆及功能研究. 昆虫学报, 56(11): 1244 - 1251]

Marco F, Tania M, 2012. Regulation and cellular functions of class II phosphoinositide 3-kinases. *Biochemical Journal*, 443(3): 587 - 601.

Park DS, Lee SK, Lee JH, Song MY, Song SY, Kwak DY, Yeo US, Jeon NS, Park SK, Yi G, Song YC, Nam MH, Ku YC, Jeon JS, 2007. The identification of candidate rice genes that confer resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) through representational difference analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 115(4): 537 - 547.

Posor Y, Eichhorn-Gruenig M, Puchkov D, Schöneberg J, Ullrich A, Lampe A, Müller R, Zarbakhsh S, Gulluni F, Hirsch E, Krauss M, Schultz C, Schmoranzer J, 2013. Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Nature*, 499(7457): 233 - 237.

Schmelzle T, Hall MN, 2000. TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, 103(2): 253 - 262.

Shioi T, Kang PM, Douglas PS, Hampe J, Yballe CM, Lawitts J, Cantley LC, Izumo S, 2000. The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO Journal*, 19(11): 2537 - 2548.

Sim C, Denlinger DL, 2009. A shut-down in expression of an insulin-like peptide, ILP-1, halts ovarian maturation during the overwintering diapause of the mosquito *Culex pipiens*. *Insect Molecular Biology*, 18(3): 325 - 332.

Stocker H, Hafen E, 2000. Genetic control of cell size. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10(5): 529 - 535.

Sun Y, Zhao SY, Tian H, Xie XY, Xiao FM, Li KL, Song YG, 2009. Depletion of PI3K p85α induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cells. *Oncol. Rep.*, 22(6): 1435 - 1441.

Teleman AA, 2010. Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*. *Biochem. J.*, 425(1): 13 - 26.

Tettweiler G, Miron M, Jenkins M, Sonenberg N, Lasko PF, 2005. Starvation and oxidative stress resistance in *Drosophila* are mediated through the eIF4E-binding protein, d4E-BP. *Genes & Development*, 19(16): 1840 - 1843.

Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B, 2010. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(5): 329 - 341.

Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P, 2012. PI3K signaling: the path to discovery and understanding. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(3): 195 - 203.

Wang Y, Chen J, Zhu YC, Ma C, Huang Y, Shen J, 2008. Susceptibility to neonicotinoids and risk of resistance development in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (Homoptera: Delphacidae). *Pest Management Science*, 64(12): 1278 - 1284.

Xue J, Zhou X, Zhang CX, Yu LL, Fan HW, Wang Z, Xu HJ, Xi Y, Zhu ZR, Zhou WW, Pan PL, Li BL, Colbourne JK, Noda H, Suetsugu Y, Kobayashi T, Zheng Y, Liu S, Zhang R, Liu Y, Luo YD, Fang DM, Chen Y, Zhan DL, Lv XD, Cai Y, Wang ZB, Huang HJ, Cheng RL, Zhang XC, Lou YH, Yu B, Zhou JC, Ye YX, Zhang WQ, Shen ZC, Yang HM, Wang J, Wang J, Bao YY, Cheng JA, 2014. Genomes of the rice pest brown planthopper and its endosymbionts reveal complex complementary contributions for host adaptation. *Genome Biology*, 15(12): 521.

Zhang Q, Lu DH, Pu J, Wu M, Han ZJ, 2012. Cloning and RNA interference effects of trehalase genes in *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(8): 911 - 920. [张倩, 鲁鼎浩, 蒲建, 吴敏, 韩召军, 2012. 灰飞虱海藻糖酶基因的克隆及 RNA 干扰效应. 昆虫学报, 55(8): 911 - 920]

(责任编辑：袁德成)